

(12) NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES
PATENTWESENS (PCT) VERÖFFENTLICHTE INTERNATIONALE ANMELDUNG

(19) Weltorganisation für geistiges Eigentum
Internationales Büro



(43) Internationales Veröffentlichungsdatum
8. Januar 2004 (08.01.2004)

PCT

(10) Internationale Veröffentlichungsnummer
WO 2004/003564 A2

(51) Internationale Patentklassifikation⁷: **G01N 33/68**,
C07K 14/435, 1/28

(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/EP2003/006748

(22) Internationales Anmeldedatum:
26. Juni 2003 (26.06.2003)

(25) Einreichungssprache: Deutsch

(26) Veröffentlichungssprache: Deutsch

(30) Angaben zur Priorität:
102 29 386.4 26. Juni 2002 (26.06.2002) DE

(71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten mit Ausnahme
von US): **EUROPROTEOME AG** [DE/DE]; Neuendorf-
str. 24b, 16761 Hennigsdorf (DE).

(72) Erfinder; und

(75) Erfinder/Anmelder (nur für US): **LAMER, Stephanie**
[DE/DE]; Schillerstr. 25, 13158 Berlin (DE). **FOGERON,**
Marie-Laure [FR/DE]; Buddestr. 11, 13507 Berlin (DE).
LAGE, Hermann [DE/DE]; Walporztheimer Str. 30,
13465 Berlin (DE). **KELLNER, Udo** [DE/DE]; Im Gang
1, 32423 Minden (DE).

(74) Anwälte: **ZIEBIG, Marlene, K.** usw.; Gulde Hengelhaupt
Ziebig, Schützenstrasse 15-17, 10117 Berlin (DE).

(81) Bestimmungsstaaten (national): AE, AG, AL, AM, AT,
AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR,
CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE,
GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR,
KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK,
MN, MW, MX, MZ, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT,
RO, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SY, TJ, TM, TN, TR,
TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW.

(84) Bestimmungsstaaten (regional): ARIPO-Patent (GH,
GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW),
eurasisches Patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ,
TM), europäisches Patent (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE,
DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IT, LU, MC, NL,
PT, RO, SE, SI, SK, TR), OAPI-Patent (BF, BJ, CF, CG,
CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Erklärung gemäß Regel 4.17:

— *Erfindererklärung (Regel 4.17 Ziffer iv) nur für US*

Veröffentlicht:

— *ohne internationalen Recherchenbericht und erneut zu ver-
öffentlichen nach Erhalt des Berichts*

*Zur Erklärung der Zweibuchstaben-Codes und der anderen Ab-
kürzungen wird auf die Erklärungen ("Guidance Notes on Co-
des and Abbreviations") am Anfang jeder regulären Ausgabe der
PCT-Gazette verwiesen.*

(54) **Title:** TUMOUR MARKER AND THE USE THEREOF FOR THE DIAGNOSIS AND TREATMENT OF TUMOUR DIS-
EASES

(54) **Bezeichnung:** TUMORMARKER UND IHRE VERWENDUNG ZUR DIAGNOSE UND THERAPIE VON TUMORER-
KRANKUNGEN

(57) **Abstract:** The invention relates to the use of the type II membrane protein NP 055070 (respectively Swiss-Prot number), NHP2-
type protein 1 P55769, pre-mRNA cleavage factor Im (25kD) NP008937, Lysyl-tRNA synthetase Q15046, UNR-interacting protein
Q9Y3F4, nucleic transport factor 2 P13662, erythrocyte phosphatase1 isoenzyme F P24666, Prefoldin sub-unit 2 Q9UHV9, hetero-
geneous nuclear ribonucleoprotein C1/C2 P07910, transitional endoplasmic reticulum-ATPase P55072, bifunctional methylenete-
trahydrofolic acid dehydrogenase P13995, 47 kDa heat-shock protein precursor P29043, ubiquinol-cytochrome C reductase complex
core protein P31930, the fragments thereof, detector substances targeting the same, and/or nucleic acids coding for the same, for
producing a means for diagnosing tumours and for the prophylactic or therapeutic treatment of tumours.

(57) **Zusammenfassung:** Es wird die Verwendung von Typ II Membranprotein NP 055070 (jeweils Swiss-Prot. Nummer), NHP2-
ähnliches Protein 1 P55769, pre-mRNA cleavage factor Im (25kD) NP008937, Lysyl-tRNA Synthetase Q15046, UNR-interagieren-
des Protein Q9Y3F4, nukleärer Transportfaktor 2 P13662, Erythrozytenphosphatase1 Isoenzyme F P24666, Prefoldin Untereinheit
2 Q9UHV9, heterogenes nukleäres Ribonucleoprotein C1/C2 P07910, transitionale endoplasmische Retikulum-ATPase P55072,
bifunktionelle Methylenetetrahydrofolsäure Dehydrogenase P13995, 47 kDa Hitzeschockprotein Vorstufe P29043, Ubichinol-Cyto-
chrom C Reductasekomplex core Protein P31930, deren Fragmente, gegen diese gerichtete Erkennungssubstanzen und/oder diese
codierende Nucleinsäuren zur Herstellung eines Mittels zur Diagnose, prophylaktischen oder therapeutischen Behandlung von Tu-
moren vorgeschlagen.



WO 2004/003564 A2

Tumormarker und ihre Verwendung zur Diagnose und Therapie
von Tumorerkrankungen

5

Die Erfindung betrifft die Verwendung von Markern zur
Detektion von Tumoren und zur Therapie von
Tumorerkrankungen. Es konnten die folgenden Proteine als
Mittel für die Krebsrisikoabschätzung, die Diagnose und die
10 Therapie von Tumoren oder Karzinomen identifiziert werden:
Typ II Membranprotein NP 055070 (jeweils Swiss-Prot.
Nummer), NHP2-ähnliches Protein 1 P55769, pre-mRNA cleavage
factor Im (25kD) NP008937, Lysyl-tRNA Synthetase Q15046,
UNR-interagierendes Protein Q9Y3F4, nukleärer
15 Transportfaktor 2 P13662, Erythrozytenphosphatase1 Isoenzyme
F P24666, Prefoldin Untereinheit 2 Q9UHV9, heterogenes
nukleäres Ribonucleoprotein C1/C2 P07910, transitionale
endoplasmische Retikulum-ATPase P55072, bifunktionelle
Methylenetetrahydrofolsäure Dehydrogenase P13995, 47 kDa
20 Hitzeschockprotein Vorstufe P29043, Ubichinol-Cytochrom C
Reductasekomplex core Protein P31930, deren Fragmente,
gegen diese gerichtete Erkennungssubstanzen und/oder diese
codierende Nucleinsäuren.

Bei einem Tumor handelt es sich um eine örtlich
25 umschriebene Zunahme von Gewebevolumen, wobei im weiteren
Sinne jede lokalisierte Anschwellung durch Ödeme, durch
akute oder chronische Entzündungen oder ähnliches als Tumor
bezeichnet werden kann. Im engeren Sinne werden jedoch nur
gewebliche Neubildungen, wie Blastom oder Neoplasie, in
30 Form eines spontanen, verschiedengradig enthemmten,
autonomen und irreversiblen Überschusswachstums von
körpereigenem Gewebe als Tumor verstanden, wobei das
Tumorstadium mit einem Verlust von spezifischen Zell- und
Gewebefunktionen verbunden ist. Die Tumore können nach ihrem

biologischen Verhalten, nach einer histogenetischen Systematik bzw. nach klinischen und pathologischen Befunden eingeteilt werden.

Im klinischen Bereich ist es erforderlich, Tumore möglichst
5 frühzeitig und selektiv zu erkennen, da eine frühzeitige Erkennung und die dann folgende Entfernung sicherstellt, dass die Geschwulst erfolgreich entfernt werden kann, ohne dass die befallenen Organe zu sehr deformiert werden und sich Metastasen bilden können. Auch bei Folgeuntersuchungen
10 nach einer Krebsoperation müssen kleinste Metastasen frühzeitig detektiert werden können, um die weitere Nachbehandlung zu optimieren. Für einige Bereiche der Arbeitsmedizin ist es weiterhin notwendig, zu bestimmen, ob ein Gewebe oder ein Organ eine potentielle
15 Krebsanfälligkeit zeigt, ohne bereits entartet oder transformiert zu sein.

Die einfachste Methode einen Tumor zu erkennen sind Tasten und Schauen. So ist zum Beispiel das Mamakarzinom als Knoten in der Brust ertastbar. Hinweise auf Hautkrebs sind
20 durch auffällige Muttermale durch den Arzt optisch zu erkennen. Andere optische Verfahren sind die bildgebenden Methoden. Hier werden mit Hilfe von Apparaten Bilder vom Körper aufgenommen, auf denen ein Tumor erkennbar ist. Zu diesen Methoden zählen zum Beispiel: Röntgen sowie
25 Computer-Tomographie (CT). Bei beiden Methoden wird der Körper mit Röntgenstrahlen durchleuchtet, wobei die entarteten Gewebestrukturen erkennbar sind. Mit Hilfe der CT können auch dreidimensionale Bilder aufgenommen werden. Häufig werden bei diesen Methoden auch so genannte
30 Kontrastmittel verwendet, die in die entsprechenden Regionen gespritzt werden und die Absorption erhöhen, wodurch Tumore besser erkennbar sind. Außerdem ist Krebsdiagnose mittels Ultraschall sowie durch die Verwendung radioaktiv markierter Antikörper möglich. Diese

erkennen tumortypische Antigene an den zu untersuchenden Organen, binden dort und können so Tumore erkennbar machen.

Neben den bildgebenden Methoden sind Laboruntersuchungen ein wichtiges Mittel zur Krebsfrüherkennung. Dabei werden

5 Proben von Urin, Blut und auch Gewebeproben auf Abnormalitäten untersucht. Dies können zum einen eine veränderte Zusammensetzung sein, aber auch das Auftreten von Substanzen die normalerweise nicht oder nur in geringen Mengen vorkommen. Diese Substanzen nennt man Tumormarker.

10 Sie werden entweder vom Tumorgewebe selbst produziert oder als Reaktion des Körpers auf den Tumor. Als Tumormarker werden neben Substanzen auch zelluläre Veränderungen bezeichnet, deren qualitative oder quantitative Analyse eine Aussage über das Vorliegen, den Verlauf oder eine

15 Prognose von bösartigen Erkrankungen ermöglicht. Tumormarker sind meist physiologisch vorkommende Substanzen, die gegenüber physiologischen Bedingungen in Serum, Urin oder anderen Körperflüssigkeiten in erhöhter oder erniedrigter Konzentration nachweisbar sind, wobei

20 diese Substanzen im Tumorgewebe synthetisiert und sezerniert und durch Tumorzerfall freigesetzt oder als Reaktion des Organismus auf einen Tumor gebildet werden. Es sind eine Vielzahl von Tumormarkern bekannt: Das Prostata-specific-Antigen (PSA) sowie die Prostatic-Acid-Phosphatase

25 kommen bei Prostata-Karzinomen vor. Alpha-Tetoprotein ist ein Protein, das normalerweise vom Fötus gebildet wird. Wenn es bei Nichtschwangeren oder Männern im Blut nachgewiesen wird, deutet es auf einen Leber- oder Keimbahn-Tumor hin. Die Lactatdehydrogenase (LDH) ist ein

30 wichtiges Enzym im menschlichen Körper und kommt in nahezu jedem Gewebe vor. Ein stark erhöhter LDH-Spiegel im Blut kann durch Krebsformen wie zum Beispiel Leukämie hervorgerufen werden. In über 50 % aller Krebsfälle kommt es zur Mutation im p53-Gen, was zur Bildung von p53-

35 Autoantikörper führen kann, die als Hinweis auf

transformierte Zellen nachgewiesen werden können. Zelluläre Tumormarker sind beispielsweise Hormonrezeptoren, Rezeptoren für wachstumsfördernde Substanzen bei Leukämie und Zellmarker, die auf eine vermehrte Expression von onkogenen Genen und ein monoklonales Zellwachstum hindeuten.

Ein Nachteil der bekannten Verfahren zur Detektion von Tumoren ist, dass sämtliche Verfahren, unabhängig davon, ob der Arzt z.B. das Prostata-Karzinom durch Ertasten detektiert oder ob spezifische Antigene zur Detektion auf der Tumoroberfläche genutzt werden, einen Tumor erst dann erkennbar machen, wenn der Tumor eine kritische Größe erreicht hat. Das heißt, frühe Stadien des Tumorwachstums können mit den bekannten Methoden und Mitteln zur Tumordiagnostik einschließlich der Verwendung von Tumormarkern nicht bestimmt werden.

Die Krebsdiagnostik mittels Tumormarker weist weitere Nachteile auf. So können Tumormarker auch bei nicht kanzerogenen Krankheiten auftreten; weiterhin bedeutet ein Nichtvorliegen oder ein Nichtnachweis von Tumormarkern nicht, dass keine Tumorerkrankung vorhanden ist. Ein weiterer Nachteil ist, dass die Tumormarker in der Regel unspezifisch sind. Das bedeutet, dass ein positiver Nachweis nur in seltenen Fällen auf die Art der Tumorerkrankung weist. Weiterhin ist nachteilig, dass mit den bekannten Mitteln und Verfahren nicht bestimmt werden kann, ob ein zurzeit noch gesundes unauffälliges Gewebe zu einem späteren Zeitpunkt entarten kann, das heißt, ob es die Tendenz aufweist, im Laufe seiner Entwicklung vom kontrollierten zum unkontrollierten Zellwachstum zu wechseln. Ein weiterer, ganz entscheidender Nachteil der bekannten Methoden der Tumorfrüherkennung ist außerdem, dass sie nicht zur Verlaufskontrolle der Entwicklung von Tumoren, beispielsweise nach einer Operation, bei der

bestimmte Geschwülste entfernt wurden, verwendet werden können. Sämtlichen bekannten Verfahren zur Tumorfrüherkennung, insbesondere bei Verwendung von Tumormarkern, ist eigen, dass sie nur einen sehr engen Bereich an Tumoren diagnostizieren können, so dass mit einer gewissen Menge an falsch positiven und falsch negativen Ergebnissen gerechnet werden muss.

Aufgabe der Erfindung war es daher, Mittel und Methoden für die Tumordiagnostik und -therapie bereit zu stellen, die die genannten Nachteile nicht aufweisen und insbesondere eine einfache, sichere und kostengünstige Detektion oder Therapie von Tumorerkrankungen erlauben.

Die vorliegende Erfindung löst dieses technische Problem durch die Verwendung von Typ II Membranprotein NP 055070 (jeweils Swiss-Prot. Nummer), NHP2-ähnliches Protein 1 P55769, pre-mRNA cleavage factor Im (25kD) NP008937, Lysyl-tRNA Synthetase Q15046, UNR-interagierendes Protein Q9Y3F4, nukleärer Transportfaktor 2 P13662, Erythrozytenphosphatase1 Isoenzyme F P24666, Prefoldin Untereinheit 2 Q9UHV9, heterogenes nukleäres Ribonucleoprotein C1/C2 P07910, transitionale endoplasmische Retikulum-ATPase P55072, bifunktionelle Methylenetetrahydrofolsäure Dehydrogenase P13995, 47 kDa Hitzeschockprotein Vorstufe P29043, Ubichinol-Cytochrom C Reductasekomplex core Protein P31930, deren Fragmente, gegen diese gerichtete Erkennungssubstanzen und/oder diese codierende Nucleinsäuren zur Herstellung eines Mittels zur Diagnose, prophylaktische oder therapeutische Behandlung von Tumoren.

Die genannten Proteine gehören funktionell oder strukturell zu eng in Beziehung stehenden Proteinfamilien. Die Tumormarker gestatten es vorteilhafterweise, Krebs in einem sehr frühen Stadium zu diagnostizieren und auch Aussagen über die zukünftige Entartung bzw. Transformation von bestimmten Geweben zu ermöglichen. Weiterhin können die

genannten Tumormarker zur Verlaufskontrolle der Entwicklung von Tumoren eingesetzt werden. Im Sinne der Erfindung gehören zu den genannten Proteine auch Polypeptide, die zu diesen zu mindestens 80%, zu mindestens 90% und besonders zu mindestens 95%, 97% oder 99% homolog sind. Die Erfindung betrifft auch durch Inversionen, Deletionen, Insertionen und Anlagerungen modifizierte Proteine, sofern zumindest ein Teil der essentiellen Funktionen der Wildtyp-Proteine vorhanden ist. Weiterhin ist es möglich, dass natürliche Aminosäuren durch synthetische Aminosäuren in den Proteinen ausgetauscht werden. Die genannten Proteine betreffen daher sowohl die natürlich vorkommenden Proteine als auch alle Modifikationen, Mutanten oder Derivate, wie mittels Rekombinationstechniken hergestellte Proteine. Ein solches Protein kann auch ungewöhnliche Aminosäuren und/oder Modifikationen, wie eine Alkylierung, Oxidation, Thiol-Modifikation, Denaturierung und Oligomerisation und dergleichen umfassen.

Eine Probe im Sinne der Erfindung ist die Bezeichnung für ein durch Probenentnahme entnommenes biologisches Gut oder ein Teil bzw. eine kleine Menge eines solchen, dessen Beschaffenheit chemisch, biologisch, klinisch oder ähnlich geprüft werden soll. Die Probenentnahme aus dem Patienten bzw. aus gewonnenen humoralen oder zellulären Bestandteilen des Patienten erfolgt insbesondere so, dass die entnommene Teilmenge einem Durchschnitt der gesamten Menge entspricht. Die durch Untersuchung der Probe ermittelten Merkmale dienen der Beurteilung der durch die Probe erfassten Menge, die Rückschlüsse auf die Gesamtmenge, z.B. ein gesamtes Organ, wie Leber, Milz, Blut oder das Immunsystem, zulässt. Für die Untersuchung können die Proben durch Mischen, Teilen, Zerkleinern, Zugabe von Enzymen oder Markern bzw. anders vorbehandelt werden. Dem Fachmann sind verschiedene Möglichkeiten der Vorbehandlung von Proben bekannt.

Nucleinsäuren im Sinne der Erfindung sind Nucleinsäuren, die entweder die Proteine, die Erkennungssubstanzen oder deren Fragmente codieren. Selbstverständlich ist es möglich, dass die Nucleinsäuren auch hybridisierende
5 Nucleinsäuren sind.

Erkennungssubstanzen im Sinne der Erfindung sind Moleküle, die mit den genannten Proteinen, den sie codierenden Nucleinsäuren oder deren Fragmenten so wechselwirken können, dass eine Detektion der Proteine und/oder der
10 Nucleinsäuren möglich ist. Die Erkennungssubstanzen können insbesondere spezifische Proteine, die die genannten Proteine binden, Antikörper, Fluoreszenzmarker, markierte Kohlenhydrate oder Lipide, Antisense-Konstrukte, cDNA- oder mRNA- Moleküle, deren Fragmente oder dergleichen sein. Es
15 ist selbstverständlich auch möglich, dass die Erkennungssubstanzen nicht die Proteine, sondern gegen diese gerichtete Antikörper, detektieren. Die Erkennungssubstanzen wären in diesem Fall z.B. sekundäre Antikörper.

20 Die Erfindung betrifft auch ein Verfahren zur Detektion von Tumoren in der biologischen Probe eines Patienten, wobei in der Probe ein Level von mindestens einem der Proteine ausgewählt aus der Gruppe bestehend aus Typ II Membranprotein NP 055070 (jeweils Swiss-Prot. Nummer),
25 NHP2-ähnliches Protein 1 P55769, pre-mRNA cleavage factor Im (25kD) NP008937, Lysyl-tRNA Synthetase Q15046, UNR-interagierendes Protein Q9Y3F4, nukleärer Transportfaktor 2 P13662, Erythrozytenphosphatase1 Isoenzyme F P24666, Prefoldin Untereinheit 2 Q9UHV9, heterogenes nukleäres
30 Ribonucleoprotein C1/C2 P07910, transitionale endoplasmische Retikulum-ATPase P55072, bifunktionelle Methylenetetrahydrofolsäure Dehydrogenase P13995, 47 kDa Hitzeschockprotein Vorstufe P29043, Ubichinol-Cytochrom C Reductasekomplex core Protein P31930, deren Fragmente,

gegen diese gerichtete Erkennungssubstanzen und/oder diese codierende Nucleinsäuren mit einem Kontroll-Level einer Kontrollprobe von einem gesunden Patienten verglichen und der Tumor anhand des modifizierten Levels in der Probe im Vergleich zu dem Kontroll-Level detektiert wird. Gesund im Sinne der Erfindung muss nicht die völlige Abwesenheit von Krankheiten oder pathogenen Veränderungen bedeuten. Der gesunde Patient stellt entweder einen einzelnen Patienten oder eine Durchschnittsmenge von Patienten dar, die als Vergleichsgruppe dergestalt dienen können, dass eine Veränderung des Levels der genannten Tumormarker bestimmt werden kann. Eine Modifikation des Levels im Vergleich zum Kontroll-Level heißt, dass die genannten Tumormarker in ihrer Konzentration oder Aktivität als Protein, als Nucleinsäure oder als Antikörper Veränderungen gegenüber einem Kontroll-Level aufweisen.

In einer besonderen Ausführungsform der Erfindung wird der Level als eine Proteinkonzentration, eine Proteinaktivität, eine Konzentration von Isoformen, eine DNA-, eine RNA-Konzentration, eine Genexpression und/oder eine Kopienanzahl einer Nucleinsäure, die für eines der Proteine codiert, bestimmt. Mit Vorteil kann der Fachmann verschiedene Möglichkeiten wählen, um den Level der Tumormarker zu bestimmen. Eine Möglichkeit ist beispielsweise die Bestimmung der Proteinkonzentration mit spektrographischen Methoden. Es ist jedoch auch möglich, den Level auf der RNA- bzw. DNA-Ebene zu bestimmen oder beispielsweise über die Aktivität der einzelnen Proteine. Es ist selbstverständlich auch möglich, dass der Tumormarker nur im Tumor vorkommt bzw. dort abwesend ist.

In einer weiteren bevorzugten Ausführungsform der Erfindung wird die Probe mit einer Erkennungssubstanz von mindestens einem der genannten Proteine in Kontakt gebracht und die Bindung der Erkennungssubstanz an das Protein bestimmt.

Erkennungssubstanzen, die mit Vorteil eingesetzt werden können, sind beispielsweise Antikörper, die gegen das Protein gerichtet sind bzw. Antisense-Konstrukte die die Proteine selbst bzw. die Nucleinsäuren, die diese Proteine codieren, binden können. Die Antikörper, die Antisense-Konstrukte oder als Erkennungssubstanz einzusetzende andere Moleküle können hierbei markiert oder nicht markiert vorliegen, wobei eine Markierung beispielsweise mit Fluoreszenzmarkern möglich ist. Es ist jedoch mit Vorteil auch möglich, nicht markierte Substanzen einzusetzen. Dem Fachmann sind verschiedene Möglichkeiten bekannt, die Wechselwirkung von Erkennungssubstanzen und Proteinen bzw. den sie codierenden Nucleinsäuren zu bestimmen. Es ist jedoch auch möglich, dass die Proteine anhand der Antikörper, die gegen sie gerichtet sind, bestimmt werden. Hierbei würde ein zweiter Antikörper, ein sogenannter Sekundärantikörper, den ursprünglich das Protein bindenden Antikörper binden und so detektieren.

Die Erfindung betrifft auch ein Verfahren zur Behandlung von Tumoren, wobei der Level der Proteine, der Erkennungssubstanzen und/oder der Nucleinsäuren modifiziert wird. Dem Fachmann sind verschiedene Möglichkeiten bekannt, den Level der genannten Substanzen oder Moleküle zu modifizieren. Der Level von Proteinen kann beispielsweise erhöht oder erniedrigt werden. Eine Erhöhung ist beispielsweise dadurch möglich, dass der Nucleinsäure, die das entsprechende Protein codiert, ein zusätzlicher Promoter vorgeschaltet wird bzw. der ursprüngliche Promoter in seiner Aktivität verstärkt wird. Weiterhin ist es möglich, die Kopienanzahl der Nucleinsäuren im entsprechenden Zielgewebe, beispielsweise einem Tumorgewebe, zu erhöhen, wodurch mehr Proteine exprimiert werden. Der Level der genannten Proteine kann jedoch auch erniedrigt werden. Es ist möglich, den Level der Proteine dadurch zu erniedrigen, dass Antisense-Konstrukte, die mit

den Nucleinsäuren, die für die Proteine codieren, wechselwirken, in das entsprechende Tumorgewebe gegeben werden, wodurch die Nucleinsäuren nicht mehr ausreichend abgelesen werden können. Es ist jedoch auch möglich, gegen
5 die Proteine gerichtete Antikörper mit diesen wechselwirken zu lassen, so dass sich die Konzentration der Proteine nicht verändert, jedoch ihre Aktivität unterdrückt wird.

In einer bevorzugten Ausführungsform der Erfindung wird bei der Behandlung von Tumoren der Level von NHP2-ähnlichem
10 Protein 1 P55769, pre-mRNA cleavage factor Im (25kD) NP008937, Lysyl-tRNA Synthetase Q15046, UNR-interagierendes Protein Q9Y3F4, heterogenes nukleäres Ribonucleoprotein C1/C2 P07910, transitionale endoplasmische Retikulum-ATPase P55072, 47 kDa Hitzeschockprotein Vorstufe P29043 und/oder
15 Ubichinol-Cytochrom C Reductasekomplex core Protein P31930 reduziert.

In einer weiteren bevorzugten Ausführungsform der Erfindung wird bei der Behandlung von Tumoren der Level von Typ II II Membranprotein NP 055070, nukleärer Transportfaktor 2
20 P13662, Erythrozytenphosphatase1 Isoenzyme F P24666, Prefoldin Untereinheit 2 Q9UHV9 und/oder bifunktionelle Methylenetetrahydrofolsäure Dehydrogenase P13995 erhöht.

Die Erfindung betrifft auch ein Mittel zur Diagnose und/oder zur Therapie von Tumorerkrankungen, welches die
25 genannten Proteine, Erkennungssubstanzen und die Nucleinsäuren umfasst.

Die Erfindung betrifft auch einen Kit zur Detektion von Tumorzellen, wobei der Kit mindestens eines der genannten Proteine, der Nucleinsäuren und/oder der
30 Erkennungssubstanzen umfasst.

Die Erfindung soll im Folgenden anhand eines Ausführungsbeispiels näher veranschaulicht werden, ohne sie darauf einzuschränken.

Beispiel

5 2D-Protein-Gelelektrophorese

Um Informationen über differentiell exprimierte Proteine zu erhalten, wurden die Zelllinien jeweils mit oder ohne Zytostatikum für 24 h behandelt. Die sensiblen parentalen Zellen wurden mit der therapeutisch im Patientenserum erreichten Dosis von 20 ng/ml Mitoxantron bzw. 250 ng/ml
10 Daunorubicin behandelt. Die resistenten Zellen hingegen wurden jeweils für den gleichen Zeitraum mit der 10-fach höheren Konzentration behandelt. Die Zellen wuchsen in 20 cm O Petrischalen und wurden in eiskaltem PBS-EDTA (10 mM
15 EDTA) abgelöst; anhaftende Zellen wurden zusätzlich abgeschabt. Die Proteinbestimmung erfolgte nach Bradford [Bradford 1976] vor der Lyse. Das Zellpellet wurde nach Zentrifugation bei 500 g direkt in 8,3 M Harnstoff, 2 M Thioharnstoff, 100 mM DTT, 4% CHAPS, 2% Servalyt 4-9
20 (Serva) und einer Spatelspitze Bromphenolblau lysiert. 100 µg Gesamtprotein wurden auf Gelsteifen aufgetragen (pH 3 - 10; Amersham Pharmacia Biotech) und über Nacht bei 50 V fokussiert (insgesamt 80 kVh bei 20 C°). Die Auftrennung nach dem Molekulargewicht erfolgte in der zweiten
25 Dimension. Hierfür wurden die Streifen 2 x für 15 min in 50 mM Tris pH 8,8 mit 6 M Harnstoff, 2% SDS, 30% Glycerin und 1% DTT inkubiert und im Ettan DALT II Apparat (Amersham Pharmacia Biotech) bei 2,5 W/Gel für 30 min, gefolgt von 19 W/Gel für 6 h, aufgetrennt [Shevchenko, Wilm et al.
30 1996]. Die kommerziell gegossenen Gele wiesen eine Polyacrylamidkonzentration von T = 12,5% mit einer Kreuzvernetzung von C = 3% auf. Die Silberfärbung der Gele

erfolgte wie von Gharahdaghi, Weinberg et al. 1999 beschrieben.

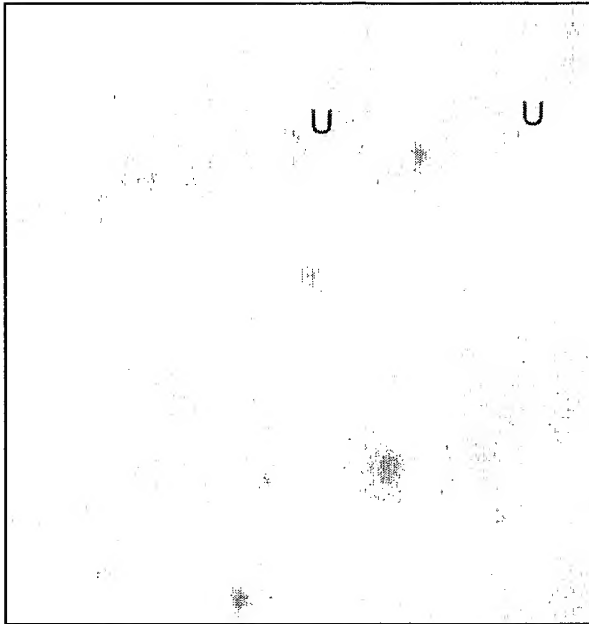


Abbildung 7: Beispiel der Proteom-Gelauswertung. Beim Proteingel nach Zytostatikumgabe wurden die Graustufen der Spots durch entsprechende Grünwerte ersetzt und mit 50%iger Transparenz über das zu vergleichende rot gefärbte Gel-Bild gelegt. Übereinanderliegende Spots, die einen Grauwert erbrachten, sind unter beiden zu vergleichenden Bedingungen gleichstark expri-miert,

während grünschimmernde überexprimiert und rotschimmernde unterexprimiert sind (in der Abbildung mit U bezeichnet).

20 Gelauswertung

Die Gele wurden anschließend eingescannt und im Computer mit Hilfe des Computerprogramms Adobe Photoshop 5.5 ausgewertet, indem die Bilder als erstes semitransparent gemacht wurden. Ein direkter Vergleich zweier Silbergele wurde erreicht, indem bei dem einen Bild schwarz durch rot
25 ersetzt wurde, bei dem anderen Bild schwarz durch grün. Nach Übereinanderlegen dieser beiden digital veränderten Bilder ergaben gleichgroße Spots einen Grauton (Proteine gleich stark expriert), wohingegen grüne oder rote Spots
30 auf eine Über- bzw. Unterexpression hindeuteten (Abbildung 7). Die Auswertung erfolgte in kleinen Arealen, in denen die passenden Spots exakt übereinander gelegt werden konnten.

Massenspektrometrische Analysen (MALDITOF)

Stark unterschiedlich exprimierte Proteine wurden massenspektrometrisch analysiert. Dafür wurden die entsprechenden Proteinspots aus dem Gel herausgeschnitten. Die ausgeschnittenen Proteinspots wurden anschließend mit Trypsin (Promega) angedaut (0,05µg Trypsin pro Spot in 15µl 50mM Ammoniumhydrogencarbonat-Puffer). Die Proteinextraktion erfolgte mit dem ZipTip System (Millipore), eluiert wurde mit 4µl 50% Acetonitril 0,1% TFA (Trifluor-Essig). Anschließend wurden 0,4µl Probe mit 0,4µl Matrix (α-cyano-4-hydroxy cinnamic Säure: 5mg/ml in 50% Acetonitril 50% H₂O 0,3% TFA) gemischt und 0,8µl auf die Träger (MALDI-Target) aufgetragen.

Als Apparatur diente der Voyager STR von Applied Biosystems (20kV; Grid Voltage: 70%; Delay 200ns; positive Reflector mode, Low mass gate 580 Da; 5 Spektren a 100Shots wurden gesammelt.

Proteomics

Auf Proteomebene interessierte uns neben der differentiellen Proteinexpression der beiden resistenten Linien im Vergleich zu den parental Zellen auch die Folgen der Zytostatikaeinwirkung an sich. Hierfür wurde die parenterale Linie jeweils mit therapeutischen, subletalen Dosen von 20ng/ml Mitoxantron und 250ng/ml Daunorubicin für 24h behandelt. Diese Dosis entspricht dem therapeutischen Durchschnittsserumlevel im Patienten. Da die beiden resistenten Linien konstant unter Mitoxantron (200ng/ml) bzw. Daunorubicin (2,5µg/ml) wachsen, interessierte uns ebenfalls, was passiert wenn man für 24h das jeweilige Zytostatikum weglässt.

Proteinspots	P 20ng/ml Mito vs. P ohne	P 0,25µg/ml Dauno vs. P ohne	RN 0,2µg/ml Mito vs. RN ohne	RDB 2,5µg/ml Mito vs. RDB ohne	RN 0,2µg/ml Mito vs. P ohne	RDB 2,5µg/ml Dauno vs. P ohne
überexprimiert	37	89	47	57	60	51
unterexprimiert	25	30	20	6	62	61
spezifisch überexprimiert	17	71	2	51	13	38
spezifisch unterexprimiert	16	23	16	3	32	48
untersuchte überexprimierte	13	20	11	3	13	14
untersuchte unterexprimierte	8	7	0	0	14	14
untersuchte spezifisch überexprimiert	1	4	0	0	1	6
untersuchte spezifisch unterexprimiert	0	2	0	0	1	3

Tabelle 6: Übersicht die Menge differentiell exprimierter Proteinspots. Spezifisch über- bzw. unterexprimiert bezeichnet die Proteine, die nur unter der oben angegebenen Bedingung differentiell exprimiert wurden. Abkürzungen:

5 Mito = Mitoxantron, Dauno = Daunorubicin, P = EPG85-257P, RN = EPG85-257RN, RDB = EPG85-257RDB.

Die resultierenden sieben 2D-Protein-Gele zeigten in etwa das gleiche Proteinspottmuster. Pro Gel konnten jeweils ca.

10 2500 Proteinspots unterschieden werden. Bei der Auswertung zeigten sich geringer Unterschiede bei den Zelllinien ± Zytostatikum, während der Vergleich zwischen den resistenten Linien und der parentalen Linie auffällig mehr Unterschiede zeigten. Die Vergleiche zeigten jeweils ein

15 teils ausgewogenes überwiegend jedoch ein Verhältnis welches zu Gunsten der Überexpression verschoben war:

Reaktionen parentalen Zellen auf Mitoxantron

Herabregulation

Die parentalen Zellen nach Mitoxantronbehandlung wiesen 25
erkennbar herabregulierte Proteinspots auf, von denen 9
5 auch unter anderen Bedingungen differentiell exprimiert
wurden (s. Abbildung 25 und Tabellen 6 & 7). Bis auf einen
Spot, wurden alle unter verschiedenen Bedingungen
herabregulierte Proteine im MALDITOF untersucht. Fünf
dieser Proteine liegen in einem Molekulargewichtsbereich
10 zwischen 19 und 35 kDa (Proteine 1-5). Die beiden Proteine
40 und 41 liegen hingegen im Molekulargewichtsbereich
zwischen ca. 130 und 170 kDa, es handelt sich jeweils um
das Acyl-CoA bindende Protein, welches für einen
reduzierten Fettstoffwechsel steht und für einen
15 reduzierten Zellumsatz (Proliferation) spricht. Das Protein
6 liegt nimmt man die Molekulargewichtsleiter zu Grunde bei
83kDa. Die MALDITOF-Analyse zeigte, dass es sich um das
Beta-1-Tubulin mit einem Molekulargewicht von 49,8kDa
handelt. Dieses Protein wurde nach Weglassen der
20 Erhaltungsdosis Daunorubicin bei den EPF85-257RDB
überexprimiert. Leider war eine MALDITOF Proteinbestimmung
der Spots 31, 40 und 41 nicht möglich, da die Proteinmenge
nicht ausreichte. Mit Ausnahme des Spots 1 lagen die
restlichen Spots 2 - 5 bei einem IP von pH 6,1. Das Protein
25 1 entspricht dem Typ II Membranprotein (20,7kDa, pH 4,8)
und wird auch bei den parentalen Zellen nach
Daunorubicingabe herabreguliert, während die Wegnahme von
Mitoxantron bzw. Daunorubicin bei den entsprechend
resistenten Zellen zu einer Überexpression führt. Das
30 gleiche Verhalten zeigen auch die Proteinspots 2 - 5 & 40,
41.

Überexpression

Unter den gleichen Versuchsbedingungen konnten 37

Proteinspots gefunden werden, die bei den mitoxantronbehandelten Zellen heraufreguliert wurden. Dabei zeigten sich 17 als spezifisch, das heißt nur unter diesen Bedingungen überexprimiert. 14 Spots sind auch unter
5 anderen Bedingungen differentiell exprimiert (Abbildung 25, Tabelle 7). Die Verteilung der beiden Spot-Gruppen lag zwischen ca. 19 und 120 kDa und der isoelektrische Punkt der Proteine war eher in den basischen Bereich bis pH 10 verschoben. 9 Proteinspots wurden nur bei den parental
10 Zellen jedoch sowohl unter Mitoxantron als auch Daunorubicin Bedingungen überexprimiert. Das Protein 38: 54 kDa nukleäres RNA- und DNA-bindendes Protein, wurde auch bei den Mitoxantron-resistenten und Daunorubicin-resistenten Zellen sowie bei den EPG85-257RN-Zellen mit
15 Mitoxantron überexprimiert, interrasanterweise nicht bei den Daunorubicin behandelten parental bzw. Daunorubicin-resistenten Zellen. Die Proteasom Untereinheit α Typ 7 (Spot 10) wurde nur bei den parental Mitoxantron-behandelten Zelle überexprimiert. Aufgrund mangelnden
20 Signals konnten die Spots 7, 9, 14, 17, 20 und 21 nicht identifiziert werden. Nur bei den parental Zellen jedoch bei beiden Zytostatika wurde die Lysyl-tRNA Synthetase (Spot 24), die Proteasom ϵ Kettenvorstufe (Spot 13) und der pre-mRNA-Schnittfaktor IM (Spot 11) gefunden werden. Das
25 heterogene nukleäre Ribonukleoprotein A1 (Spot 12) wird unter allen Bedingungen überexprimiert. Das Protein mit der Spotnummer 8 (NHP2-ähnliches Protein 1) wird bei den parental unter Gabe beider Zytostatika und bei den resistenten unter Mitoxantron exprimiert.

Reaktionen parentalen Zellen auf Daunorubicin

Herabregulation

Die parentalen Zellen wiesen nach Daunorubicinbehandlung 30
erkennbar herabregulierte Proteinspots auf. Davon wurden 7
5 auch unter anderen Bedingungen differentiell exprimiert (s.
Abbildung 25 und Tabelle 7). Wie bei der
Mitoxantronbehandlung, liegen fünf der auch unter anderen
Bedingungen differentiell herabregulierten Proteine in
einem Molekulargewichtsbereich zwischen 19 und 35 kDa
10 (Proteine 1-5; s. 4.1.1.1.). Die ebenfalls unter
verschiedenen Bedingungen differentiell exprimierten
Proteine 40 und 41 liegen hingegen im
Molekulargewichtsbereich zwischen ca. 130 und 170 kDa (s.
4.1.1.1). Alle Proteine wiesen einen isoelektrischen Wert
15 im neutralen oder leicht sauren pH Bereich auf, lediglich 2
Proteinspots die unter diesen Bedingungen spezifisch
herabreguliert wurden befanden sich im leicht basischen
Bereich. Wie zuvor beschrieben, handelt es sich bei den
Spots 3 und 4 jeweils um das Acyl-CoA bindende Protein. Bei
20 dem einen der beiden mittels MALDITOF-untersuchten hier
spezifisch differentiell exprimierten Spots handelt es sich
um das Ubiquitin-Konjugations Enzym E2-17 (Spot 16). Der
andere Spot konnte wegen einer Keratinkontamination o. wg.
Keratin nicht bestimmt werden.

25 Überexpression

Unter den gleichen Versuchsbedingungen konnten hingegen 89
Proteinspots bei den daunorubicinbehandelten Zellen
heraufreguliert gefunden werden. Dabei zeigten sich 71
Spots nur unter diesen Bedingungen differentiell
30 exprimiert, während 18 Spots auch unter anderen Bedingungen
eine veränderte Expression aufwiesen (Abbildung 26, Tabelle
7). Die Verteilung der beiden Spot-Gruppen lag zwischen ca.
20 und 120 kDa und der isoelektrische Punkt der Proteine

war eher in den basischen Bereich bis pH 10 verschoben, wobei auch Proteine im sauren Bereich vorkamen. 9 Proteinspots wurden nur bei den parental Zellen jedoch sowohl unter Mitoxantron als auch Daunorubicin Bedingungen
5 überexprimiert. 4 für die Versuchsbedingungen spezifisch überexprimiert Spots wurden im MALDITOF untersucht: Der Spot 18 entspricht dem RHO GDP-Dissoziations Inhibitor der schon in einer Mitoxantron-resistenten Fibrosarkomzelllinie überexprimiert gefunden wurde, während die anderen aus
10 verschiedenen Gründen nicht zu bestimmen waren (Tabelle 7). Der Spot 26 ergab kein Datenbankergebnis, wobei die ATP-Synthetase als Kandidat in Frage kommt.

Reaktionen Mitoxantron-resistenter Zellen auf Mitoxantronabwesenheit

15 Überexpression bei den unbehandelten Zellen

Wird die Erhaltungsdosis Mitoxantron bei den Mitoxantron-resistenten Zellen weggelassen, so werden 20 Proteinspots erkennbar hochreguliert. Davon wurden 4 auch unter anderen Bedingungen differentiell exprimiert (s. Abbildung 27 und
20 Tabelle 7). 4 unter diesen Bedingungen spezifische Proteine liegen allen mit ihren IP bei pH 4, während die anderen, die z. T. auch unter anderen Bedingungen hochreguliert wurden im alkalischen Bereich liegen. Das Molekulargewicht der gefundenen Proteinspots liegt zwischen ca. 37 und
25 100kDa.

Überexpression bei den behandelten Zellen

Unter diesen Bedingungen sind 47 Proteine bei den behandelten Zellen überexprimiert. Dabei reicht das Proteinspektrum entsprechend der Gelaufklärung von 19 bis
30 200kDa sowie von sauer (nahe pH3) bis basisch (nahe pH10). Interessanterweise konnten nur 2 Spots gefunden werden, die exklusiv nur unter diesen Bedingungen nur bei den Mitoxantron-resistenten Zellen differentiell exprimiert

wurden (ein basisches Protein mit einem IP bei pH 10 und Molekulargewicht von ca. 55kDa, sowie einem sauren Protein mit einem IP nahe 3,0 und Molekulargewicht bei 120kDa). Alle anderen gefunden Spots sind auch unter anderen vergleichbaren Bedingungen differentiell exprimiert (45 Spots). Auffällig und in der Abbildung 27 mit Sternen gekennzeichnet ist ein Proteinpatter von 34 im Gel breit gestreut liegenden Spots, welches nur bei mitoxantronbehandelten resistenten Zellen auftritt (vs. EPG85-257P und RN unbehandelt). Es handelt sich somit Regulierbare resistenzassoziierte Proteine. Mittels MALDITOF wurden 11 Proteinspots untersucht, die auch unter anderen Bedingungen überexprimiert wurden (Tabelle 7). Es handelt sich um das bereits beschrieben NHP2 ähnliche Protein 1 (Spot 8), das heterogene nukleäre Ribonukleoprotein A1 (Spots 12 & 23), das Heterogene nukleäre Ribonukleoprotein C/C2 (Spots 33 & 34), die transitionale endoplasmatische Retikulum-ATPase (Spot 35), das 54kDa nukleäre RNA- und DNA-bindende Protein (Spot 38) und die Glutathion S-Transferase (Spot 48). Dabei wird die Glutathion S-Transferase bei den beiden Resistenten Linien verglichen zur parentalen Linien hochreguliert und die Expression lässt sich bei der Mitoxantron-resistenten Linien durch Mitoxantrongabe noch steigen. Die Spots 17, 32 und 37 ergaben aus technischen Gründen kein auswertbares Signal.

Reaktionen Daunorubicin-resistenter Zellen auf Daunorubicinabwesenheit

Überexpression bei den unbehandelten Zellen

Wird die Erhaltungsdosis Daunorubicin bei den Daunorubicin-resistenten Zellen weggelassen, so werden 6 Proteinspots erkennbar hochreguliert. Davon wurde die Hälfte (3) auch unter anderen Bedingungen differentiell exprimiert (s. Abbildung 28 und Tabelle 7). Das Molekulargewicht der

gefundenen Proteinspots liegt zwischen ca. 32 und 100kDa. Ein Proteinspot (ca. 90kDa, IP bei 4 - 5) ist nur bei Daunorubicin-behandelten Zellen herabreguliert (bzw. bei den unbehandelten überexprimiert; EPG85-257P und RDB; Markierung mit *).

Überexpression bei den behandelten Zellen

Unter diesen Bedingungen sind 57 Proteine bei den behandelten Zellen überexprimiert. Dabei reicht das differentielle Proteinspektrum von 19 bis 120kDa sowie von sauer (nahe pH3) bis basisch (nahe pH10). Interessanterweise konnten nur 6 Spots gefunden werden, die exklusiv nur unter diesen Bedingungen nur bei den Daunorubicin-resistenten Zellen differentiell exprimiert wurden. Alle anderen gefunden Spots sind auch unter anderen vergleichbaren Bedingungen differentiell exprimiert (51 Spots). Im Gegensatz zu der Beobachtung bei Mitoxantron-behandelten Zellen ist hier lediglich ein mit einem Sternchen gekennzeichnet Protein, welches nur bei daunorubicin-behandelten Zellen auftritt (EPG85-257P und RDB; IP um 5, ca. 35kDa). Mittels MALDITOF wurden 3 Proteinspots untersucht, die auch unter anderen Bedingungen überexprimiert wurden (Tabelle 7). Es handelt sich um die bereits beschriebene Beta-1-Kette des Tubulins (Spot 7) und das heterogene nukleäre Ribonukleoprotein A1 (Spots 12 & 23). Dabei wird die Beta-1-Kette des Tubulins auch bei den beiden parental Zellen unter Mitoxantron- und Daunorubicin-gabe differentiell exprimiert.

Veränderungen der Mitoxantron-resistenten Zellen gegenüber den parental

Herabregulation

Die resistenten Zellen wiesen verglichen mit den parental Zellen 62 erkennbar herabregulierte Proteinspots auf. Davon wurden 29 auch unter anderen Bedingungen differentiell

exprimiert, sind also nicht spezifisch für diese Resistenz (s. Abbildung 29 und Tabelle 7). Die gefundenen Proteine liegen im Molekulargewichtsbereich von ca. 19 - 150kDa und einem IP von ca. 3,5 - 9. Die auch unter anderen Bedingungen differentiell exprimierten Proteine liegen zum Grossteil im sauren niedermolekularen Bereich geclustert (Abbildung 29, linker Blot links unten). 12 untersuchten bei den resistenten Zellen herabregulierten Proteine gehören zu den auch unter anderen Bedingungen differentiell exprimierten Proteinen. Dazu gehören die beiden Spots 3 und 4 die jeweils dem Acyl-CoA bindenden Protein entsprechen, das Typ II membranbindende Protein (Spot 1), das epidermale Fettsäure bindende Protein (Spot 28) und das Isoenzym F der Erythrozyten sauren Phosphatase 1 (Spot 29), während die Spots 5, 40 und 41 jeweils kein auswertbares Signal ergaben. Spezifisch unter diesen Bedingungen wurden die Spots 27 und 30 und 31 expremiert. Es handelt sich um den nukleären Transportfaktor 2 (27) und die Prefoldin Untereinheit 2, während der Spot 31 kein Ergebnis ergab.

20 Überexpression

Unter den gleichen Versuchsbedingungen konnten 60 Proteinspots gefunden werden, die bei den Mitoxantron-resistenten Zellen heraufreguliert wurden. Dabei zeigten sich 36 als spezifisch, das heißt nur unter diesen Bedingungen überexprimiert. 14 Spots sind auch unter anderen Bedingungen differentiell exprimiert (Abbildung 29, Tabelle 7). Die Verteilung der Proteine lag zwischen ca. 19 und 150 kDa und der isoelektrische Punkt war ebenfalls gleichmäßig verteilt. 14 Proteinspots wurden spezifisch nur bei den resistenten Zellen überexprimiert während 46 auch unter anderen Bedingungen differentiell exprimiert wurden. Auffällig und in der Abbildung 29 mit Sternen gekennzeichnet ist ein Proteinpattern von 34 im Gel breit gestreut liegenden Spots, welche nur bei

mitoxantronbehandelten resistenten Zellen auftritt (vs. EPG85-257P und RN unbehandelt). Es handelt sich somit regulierbare resistenzassoziierte Proteine.

Untersucht wurden 14 Spots, davon einer spezifisch in diesem Vergleich differentiell expremiert (Spot 39). Dabei handelt es sich um heterogene nukleäre Ribonucleoprotein A2/B1. Die auch unter anderen Bedingungen differentiell expremiert Proteine sind: Das NHP2-ähnliche Protein 1 (Spot 8), das Heterogene nukleäre Ribonukleoprotein A1 (Spots 12 & 23), Das UNR-interagierende Protein (Spot 25) das heterogene nukleäre Ribonukleoprotein C1/C2 (Spots 33, 34), die transitionale endoplasmatische Retikulum-ATPase (Spot 35), das Protein 54 kDa nukleäre RNA- und DNA-bindendes Protein (Spot 38) und die Glutathion S-Transferase (Spot 48). Der Spot 37 ergab kein Signal. Spezifisch wurde das heterogene nukleäre Ribonukleoprotein A2/B1 und der Spot 36, der kein Signal ergab expremiert.

Veränderungen der Daunorubicin-resistenten Zellen gegenüber den parental

Herabregulation

Die resistenten Zellen wiesen verglichen mit den parental Zellen 61 erkennbar herabregulierte Proteinspots auf. Davon wurden 13 auch unter anderen Bedingungen differentiell expremiert, sind also nicht spezifisch für diese Resistenz (s. Abbildung 30 und Tabelle 7). Die gefundenen Proteine liegen im Molekulargewichtsbereich von ca. 19 - 150kDa und einem IP von ca. 3 - 10. Die auch unter anderen Bedingungen differentiell expremierten Proteine liegen zum Grossteil im sauer/neutralen niedermolekularen Bereich geclustert (pH 19 - 35; Abbildung 30, linker Blot links unten). 11 untersuchte bei den resistenten Zellen herabregulierten Proteine gehören zu den auch unter anderen Bedingungen differentiell expremierten Proteinen. Dazu gehören die

beiden Spots 3 und 4 die jeweils dem Acyl-CoA bindenden Protein entsprechen, die beta-1 Kette des Tubulins (Spot 6), das Ubiquitin-Konjugations Enzym E2-17kDa (Spot 16), das epidermale Fettsäure bindende Protein (Spot 28) und das Isoenzym F der Erythrozyten sauren Phosphatase 1 (Spot 29), während die Spots 2, 5, 15, 31, 40 und 41 jeweils kein auswertbares Signal ergaben. Interessanterweise kommt das Isoenzym F der Erythrozyten sauren Phosphatase 1 nur bei beiden resistenten Zellen im Vergleich zu den parental

10 Zellen vor (EPG85-257RN und RDB). Spezifisch unter diesen Bedingungen wurden die bifunktionale Methylenetetrahydrofolsäure Dehydrogenase (Spot 42), die mitochondrale Vorstufe der Enoyl-CoA Hydratase (Spot 43) und die Transaldolase (Spot 44) exprimiert.

15 Überexpression

Unter den gleichen Versuchsbedingungen konnten 51 Proteinspots gefunden werden, die bei den Daunorubicin-resistenten Zellen heraufreguliert wurden. Dabei zeigten sich 38 als spezifisch, das heißt nur unter diesen

20 Bedingungen überexprimiert. 13 Spots sind auch unter anderen Bedingungen differentiell expremiert (Abbildung 30, Tabelle 7). Die Verteilung der Proteine lag zwischen ca. 32 und 130 kDa und der isoelektrische Punkt war ebenfalls gleichmäßig verteilt. 14 Proteinspots wurden spezifisch nur

25 bei den resistenten Zellen überexprimiert während 46 auch unter anderen Bedingungen differentiell expremiert wurden. Im Gegensatz zu den zahlreichen auffälligen mit Sternen gekennzeichnet Proteinspots welche nur bei mitoxantronbehandelten resistenten Zellen auftraten (vs.

30 EPG85-257P und RN unbehandelt) gibt es für Daunorubicin nur einen derartigen ebenfalls mit einem Stern markierten Spot (Abbildung 30). Es handelt sich somit um lediglich ein regulierbares resistenzassoziiertes Protein.

Untersucht wurden 14 Spots, davon wurden sechs spezifisch

in diesem Vergleich überexprimiert (Spots 45 - 47 & 49 - 51). Dabei handelt es sich um den Spot 45, hinter dem sich als einzigem 3 verschiedenen Proteine verbergen: die mitochondriale Vorstufe der Aspartat Aminotransferase, die
5 Vorstufe des kollagenbindenden Proteins 2 und die Vorstufe des 47kDa Hitzeschockproteins. Des Weiteren gehören dazu Annexin I (Spot 46), der Eta-Typ der Proteinkinase C (Spot 47), das Cor Protein der Ubiquinol-Cytochrom C Reduktase (Spot 49) und das 54kDa nukleäre RNA- und DNA-bindende
10 Protein (Spots 50 & 51). Die auch unter anderen Bedingungen differentiell expremiert Proteine sind: das heterogene nukleäre Ribonukleoprotein A1 (Spot 12 & 23), das UNR-interagierende Protein (Spot 25) das heterogene nukleäre Ribonukleoprotein C1/C2 (Spots 33, 34) und das Protein
15 54 kDa nukleäre RNA- und DNA-bindendes Protein (Spot 38) sowie die Glutathion S-Transferase (Spot 48). Die Spots 7 & 32 ergaben kein Signal.

Patentansprüche

1. Verwendung von Typ II Membranprotein NP 055070 (jeweils
5 Swiss-Prot. Nummer), NHP2-ähnliches Protein 1 P55769,
pre-mRNA cleavage factor Im (25kD) NP008937, Lysyl-tRNA
Synthetase Q15046, UNR-interagierendes Protein Q9Y3F4,
nukleärer Transportfaktor 2 P13662,
Erythrozytenphosphatase1 Isoenzyme F P24666, Prefoldin
10 Untereinheit 2 Q9UHV9, heterogenes nukleäres
Ribonucleoprotein C1/C2 P07910, transitionale
endoplasmische Retikulum-ATPase P55072, bifunktionelle
Methylenetetrahydrofolsäure Dehydrogenase P13995, 47
kDa Hitzeschockprotein Vorstufe P29043, Ubichinol-
15 Cytochrom C Reductasekomplex core Protein P31930, deren
Fragmente, gegen diese gerichtete Erkennungssubstanzen
und/oder diese codierende Nucleinsäuren zur Herstellung
eines Mittels zur Diagnose, prophylaktischen oder
therapeutischen Behandlung von Tumoren.
- 20
2. Verfahren zur Detektion von Tumoren in einer Probe von
einem Patienten, dadurch gekennzeichnet, dass in der
Probe ein Level von mindestens einem der Proteine
ausgewählt aus der Gruppe bestehend aus Typ II
25 Membranprotein NP 055070 (jeweils Swiss-Prot. Nummer),
NHP2-ähnliches Protein 1 P55769, pre-mRNA cleavage
factor Im (25kD) NP008937, Lysyl-tRNA Synthetase
Q15046, UNR-interagierendes Protein Q9Y3F4, nukleärer
Transportfaktor 2 P13662, Erythrozytenphosphatase1
30 Isoenzyme F P24666, Prefoldin Untereinheit 2 Q9UHV9,
heterogenes nukleäres Ribonucleoprotein C1/C2 P07910,
transitionale endoplasmische Retikulum-ATPase P55072,
bifunktionelle Methylenetetrahydrofolsäure

Dehydrogenase P13995, 47 kDa Hitzeschockprotein
Vorstufe P29043, Ubichinol-Cytochrom C Reductasekomplex
core Protein P31930, deren Fragmente, gegen diese
gerichtete Erkennungssubstanzen und/oder diese
5 codierende Nucleinsäuren bestimmt, dieser Level mit
einem Kontroll-Level einer Kontrollprobe von einem
gesunden Patienten verglichen und der Tumor anhand des
modifizierten Levels in der Probe im Vergleich zu dem
Kontroll-Level detektiert wird.

10

3. Verfahren nach Anspruch 2,
dadurch gekennzeichnet, dass
als der Level eine Proteinkonzentration, eine
15 Proteinaktivität, eine Konzentration von Isoformen,
eine DNA-, eine RNA-Konzentration, eine Genexpression
und/oder eine Kopienanzahl einer Nucleinsäure, die für
eines der Proteine codiert, bestimmt werden.

20

4. Verfahren nach Anspruch 2 oder 3,
dadurch gekennzeichnet, dass
die Probe mit einer Erkennungssubstanz für mindestens
eines der Proteine in Kontakt gebracht wird und die
25 Bindung der Erkennungssubstanz an das Protein bestimmt
wird.

5. Verfahren zur Behandlung von Tumoren, dadurch
30 gekennzeichnet, dass der Level der Proteine, der
Erkennungssubstanzen und/oder der Nucleinsäuren nach
einem der Ansprüche 1 bis 3 modifiziert wird.

6. Verfahren nach dem vorhergehenden Anspruch,
dadurch gekennzeichnet, dass
der Level von NHP2-ähnlichem Protein 1 P55769, pre-mRNA
cleavage factor Im (25kD) NP008937, Lysyl-tRNA
5 Synthetase Q15046, UNR-interagierendes Protein Q9Y3F4,
heterogenes nukleäres Ribonucleoprotein C1/C2 P07910,
transitionale endoplasmische Retikulum-ATPase P55072,
47 kDa Hitzeschockprotein Vorstufe P29043, und/oder
Ubichinol-Cytochrom C Reductasekomplex core Protein
10 P31930 reduziert wird.
7. Verfahren nach Anspruch 5,
dadurch gekennzeichnet, dass
15 der Level von Typ II Membranprotein NP 055070,
nukleärer Transportfaktor 2 P13662, Erythrozytenphos-
phatase1 Isoenzyme F P24666, Prefoldin Untereinheit 2
Q9UHV9, und/oder bifunktionelle
Methylenetetrahydrofolsäure Dehydrogenase P13995,
20 erhöht wird.
8. Mittel zur Diagnose und/oder Therapie von
Tumorerkrankungen umfassend Typ II Membranprotein NP
25 055070 (jeweils Swiss-Prot. Nummer), NHP2-ähnliches
Protein 1 P55769, pre-mRNA cleavage factor Im (25kD)
NP008937, Lysyl-tRNA Synthetase Q15046, UNR-
interagierendes Protein Q9Y3F4, nukleärer
Transportfaktor 2 P13662, Erythrozytenphosphatase1
30 Isoenzyme F P24666, Prefoldin Untereinheit 2 Q9UHV9,
heterogenes nukleäres Ribonucleoprotein C1/C2 P07910,
transitionale endoplasmische Retikulum-ATPase P55072,
bifunktionelle Methylenetetrahydrofolsäure
Dehydrogenase P13995, 47 kDa Hitzeschockprotein
35 Vorstufe P29043, Ubichinol-Cytochrom C Reductasekomplex

core Protein P31930, deren Fragmente, gegen diese gerichtete Erkennungssubstanzen und/oder diese codierende Nucleinsäuren.

- 5 9. Kit zur Detektion von Tumorzellen, dadurch gekennzeichnet, dass er mindestens ein Protein, eine Nucleinsäure und/oder eine Erkennungssubstanz nach einem der Ansprüche 1 bis 3 umfasst.

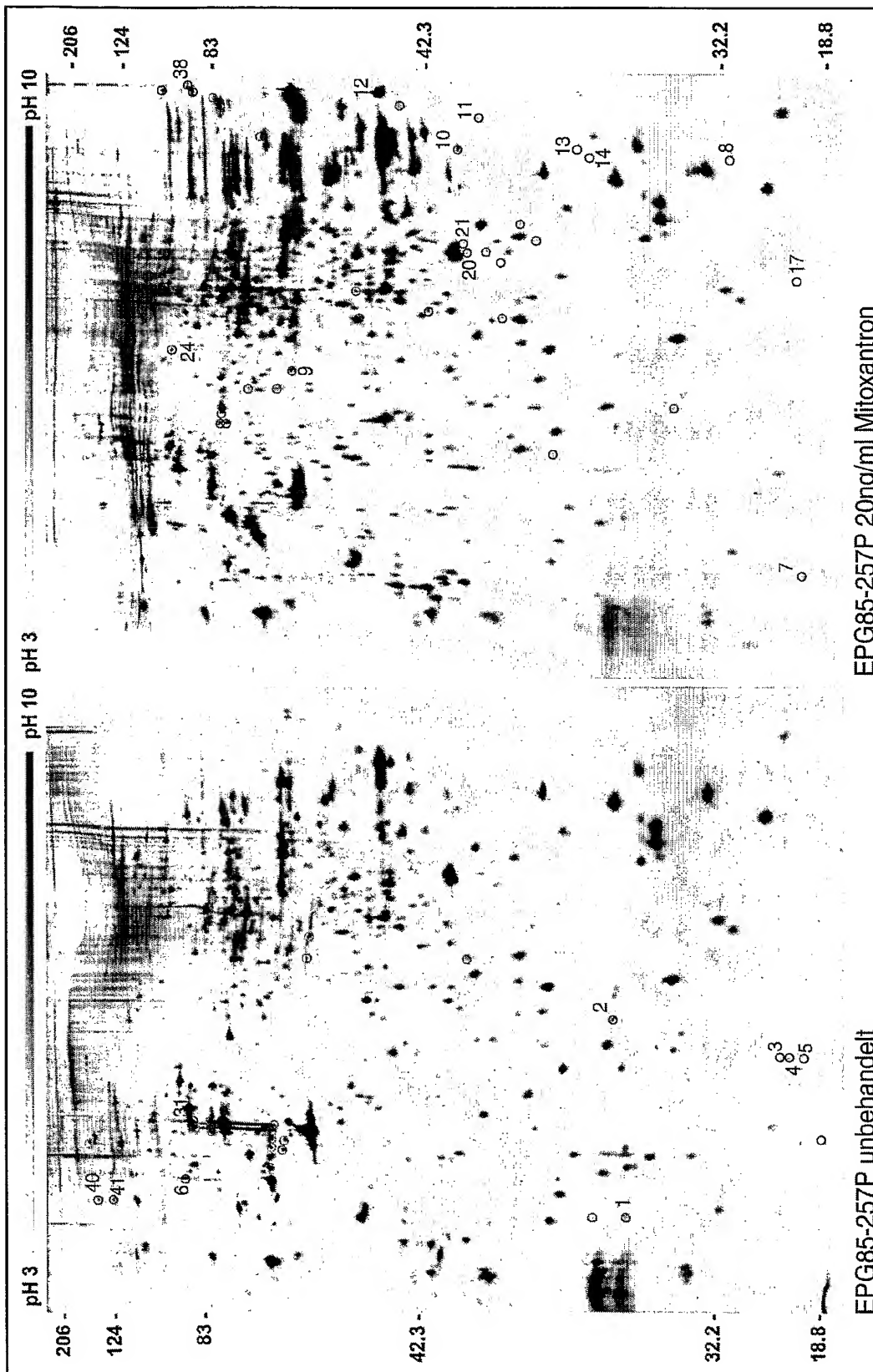


Abbildung 25: Zweidimensionale Proteinelektrophorese der EPG85-257P-Zellen \pm Mitoxantron 20ng/ml für 24h. Spots die im jeweiligen Gel intensiver als im Vergleich vorliegen, sind durch farbige Kreise markiert. Proteine die nach Mitoxantronbehandlung herabreguliert wurden sind im Gel der unbehandelten Zellen (links) rot markiert, während Proteinspots die intensiver vorliegen im Gel der Mitoxantron behandelten Zellen grün markiert wurden. Blauen markierte Spots sind in dem jeweiligen Gel hochreguliert, kommen aber auch überexprimiert in anderen vergleichen vor, so sind z. B. die Spots 1-5 sind immer herabreguliert, wenn Zellen aller drei Linien mit Zytostatika behandelt wurden. In der Massenspektrometrie untersuchte Spots sind zusätzlich durch Nummern gekennzeichnet. Das Molekulargewicht in kDa ist jeweils an der linken und rechten Seite angebracht, der pH Gradient ist jeweils über den Gelen zu sehen.

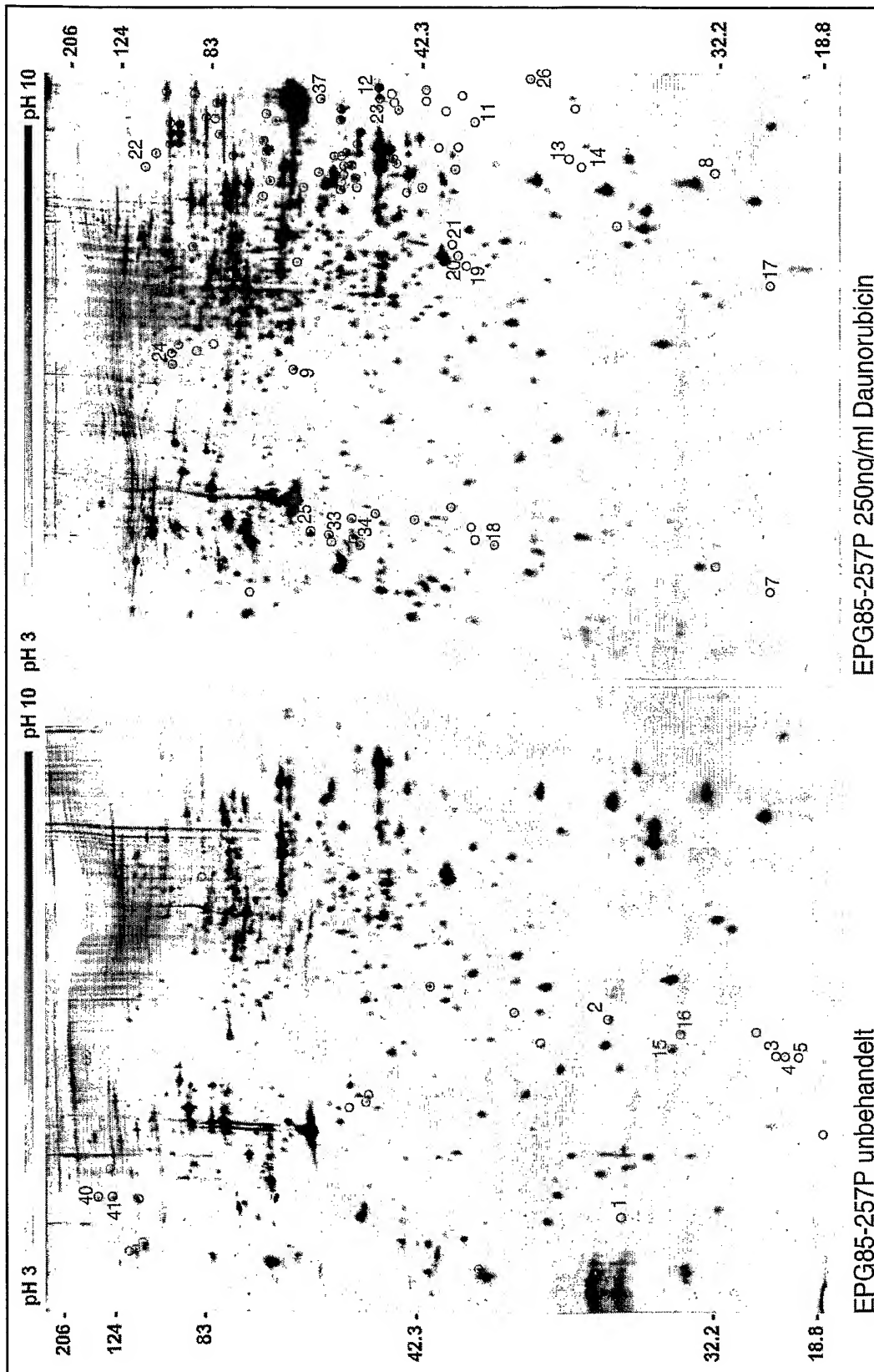


Abbildung 26: Zweidimensionale Proteinelektrophorese der EPG85-257P-Zellen \pm 250ng/ml Daunorubicin für 24h. Spots die im jeweiligen Gel intensiver als im Vergleich vorliegen, sind durch farbige Kreise markiert. Proteine die nach Daunorubicinbehandlung herabreguliert wurden sind im Gel der unbehandelten Zellen (links) rot markiert, während Proteinspots die intensiver vorliegen im Gel der Daunorubicin behandelten Zellen grün markiert wurden. Blaumarkierte Spots sind in dem jeweiligen Gel hochreguliert, kommen aber auch überexprimiert in anderen Vergleichen vor. In der Massenspektrometrie untersuchte Spots sind zusätzlich durch Nummern gekennzeichnet. Das Molekulargewicht in kDa ist jeweils an der linken bzw. rechten Seite angebracht, der pH Gradient ist jeweils über den Gelen zu sehen.

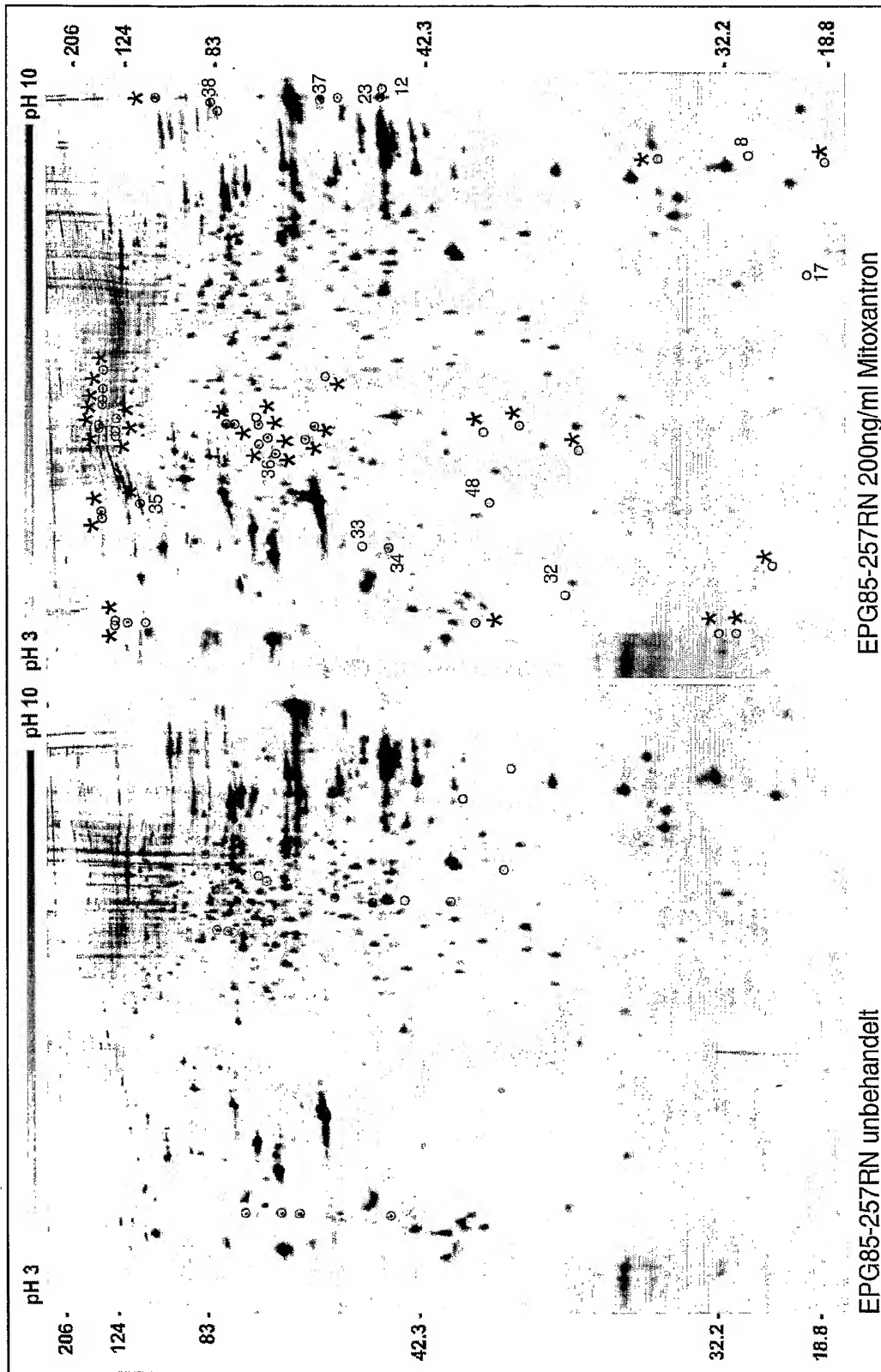


Abbildung 27: Zweidimensionale Proteinelektrophorese der EPG85-257RN-Zellen \pm 200ng/ml Mitoxantron für 24h. Spots die im jeweiligen Gel intensiver als im Vergleich vorliegen, sind durch farbige Kreise markiert. Proteine die nach Mitoxantronbehandlung herabreguliert wurden sind im Gel der unbehandelten Zellen (links) rot markiert, während Proteinspots die intensiver vorliegen im Gel der Mitoxantron behandelten Zellen grün markiert wurden. Blaumarkierte Spots sind in dem jeweiligen Gel hochreguliert, kommen aber auch überexprimiert in anderen Vergleichen vor. In der Massenspektrometrie untersuchte Spots sind zusätzlich durch Nummern gekennzeichnet. Das Molekulargewicht in kDa ist jeweils an der linken bzw. rechten Seite angebracht, der pH Gradient ist jeweils über den Gelen zu sehen.

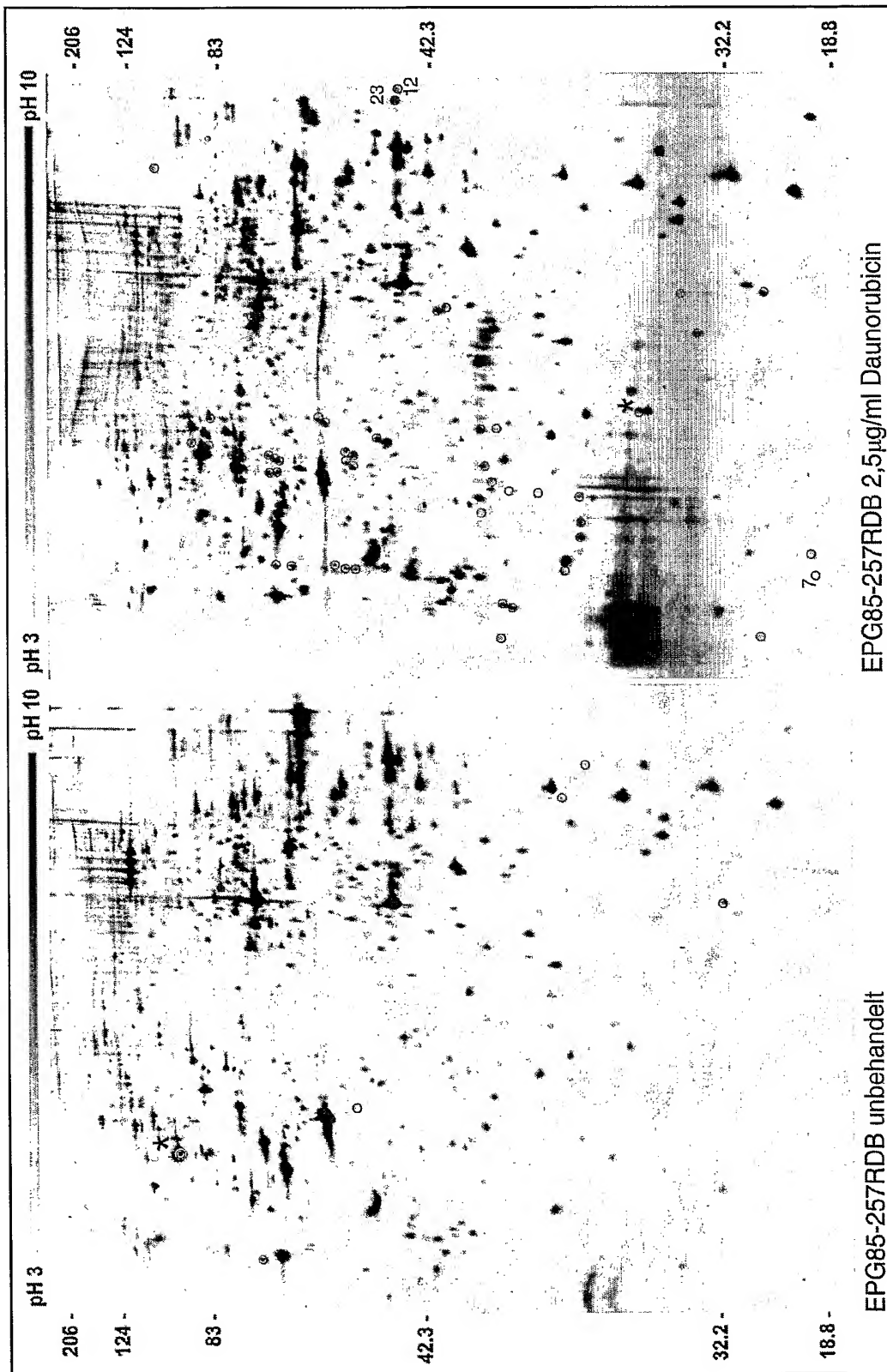


Abbildung 28: Zweidimensionale Proteinelektrophorese der EPG85-257RDB-Zellen \pm 2,5µg/ml Mitoxantron für 24h. Spots die im jeweiligen Gel intensiver als im Vergleich vorliegen, sind durch farbige Kreise markiert. Proteine die nach Mitoxantronbehandlung herabreguliert wurden sind im Gel der unbehandelten Zellen (links) rot markiert, während Proteinspots die intensiver vorliegen im Gel der Daunorubicin behandelten Zellen grün markiert wurden. Blaumarkierte Spots sind in dem jeweiligen Gel hochreguliert, kommen aber auch überexprimiert in anderen Vergleichen vor. In der Massenspektrometrie untersuchte Spots sind zusätzlich durch Nummern gekennzeichnet. Das Molekulargewicht in kDa ist jeweils an der linken bzw. rechten Seite angebracht, der pH Gradient ist jeweils über den Gelen zu sehen.

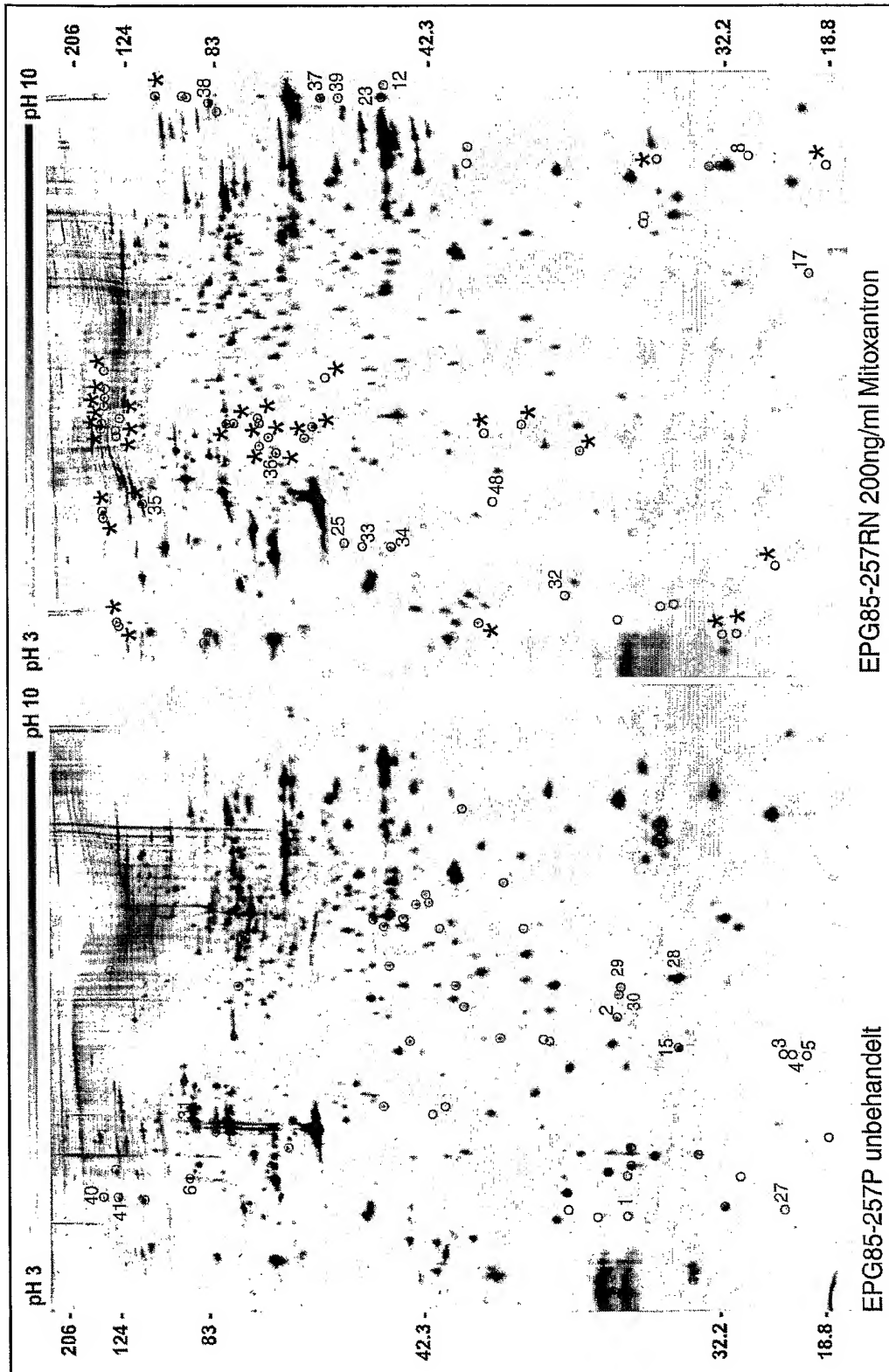


Abbildung 29: Zweidimensionale Proteinelektrophorese der EPG85-257RN vs. -257P Zellen. Spots die im jeweiligen Gel intensiver als im Vergleich vorliegen, sind durch farbige Kreise markiert. Proteine die in den EPG85-257RN-Zellen geringer exprimiert wurden sind im Gel der parentalen Zellen (links) rot markiert, während Proteinspots die intensiver bei den resistenten Zellen vorliegen im Gel der EPG85-257RN-Zellen grün markiert wurden. Blaumarkierte Spots sind in dem jeweiligen Gel hochreguliert, kommen aber auch überexprimiert in anderen Vergleichen vor. In der Massenspektrometrie untersuchte Spots sind zusätzlich durch Nummern gekennzeichnet. Das Molekulargewicht in kDa ist jeweils an der linken bzw. rechten Seite angebracht, der pH Gradient ist jeweils über den Gelen zu sehen.

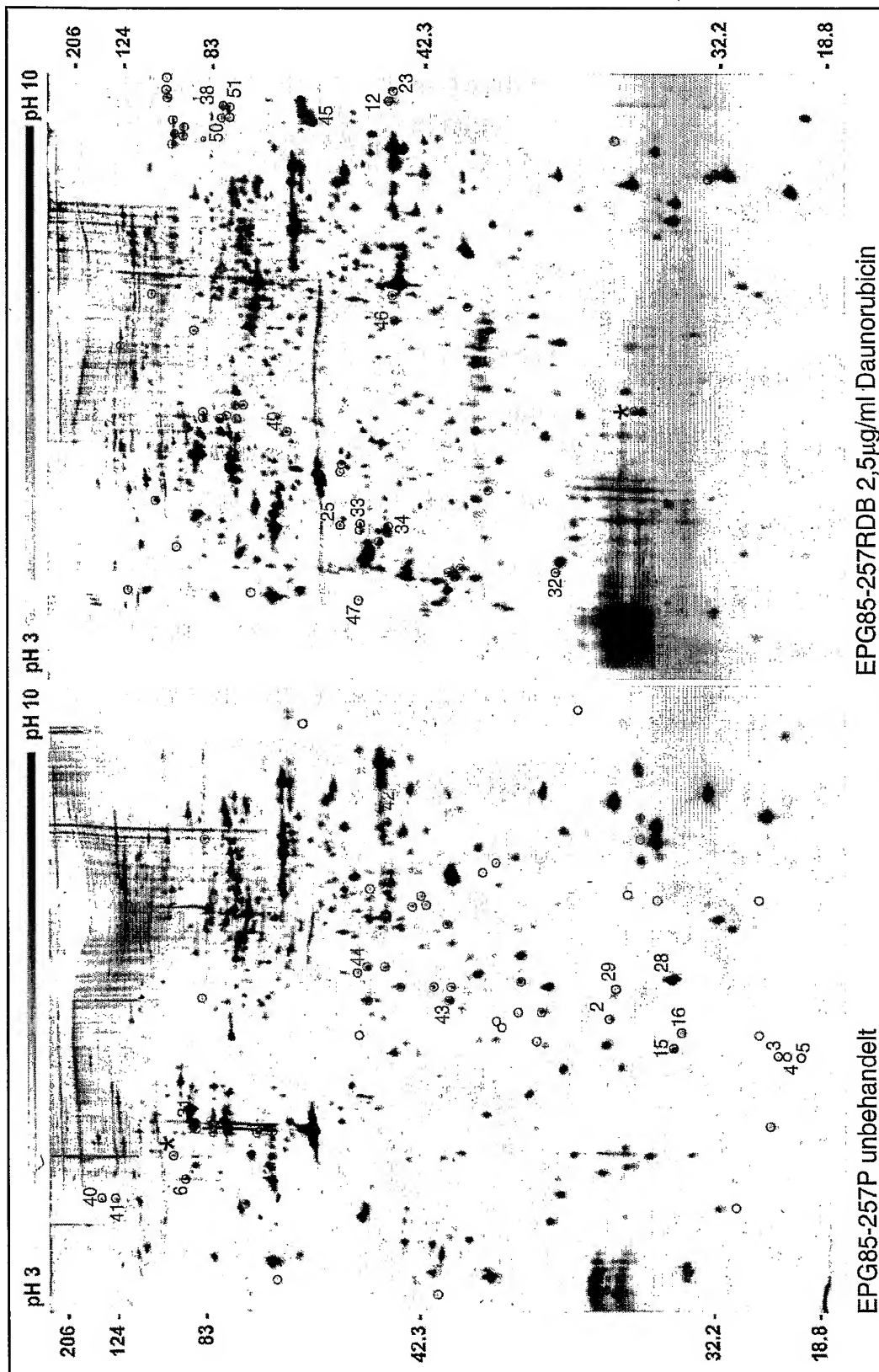


Abbildung 30: Zweidimensionale Proteinelektrophorese der EPG85-257RDB vs. -257P-Zellen. Spots die im jeweiligen Gel intensiver als im Vergleich vorliegen, sind durch farbige Kreise markiert. Proteine die in den EPG85-257RDB-Zellen geringer exprimiert wurden sind im Gel der parentalen Zellen (links) rot markiert, während Proteinspots die intensiver bei den resistenten Zellen vorliegen im Gel der EPG85-257RDB-Zellen grün markiert wurden. Blaumarkierte Spots sind in dem jeweiligen Gel hochreguliert, kommen aber auch überexprimiert in anderen Vergleichen vor. In der Massenspektrometrie untersuchte Spots sind zusätzlich durch Nummern gekennzeichnet. Das Molekulargewicht in kDa ist jeweils an der linken bzw. rechten Seite angebracht, der pI Gradient ist jeweils über den Gelen zu sehen.

Spot	Sequenz Erfassung (%)	Proteinname	Swiss Prot Nr.	MW	Isoelektrischer Punkt	P 20ng/ml Mito vs. P ohne	P 0,25µg/ml Dauno vs. P ohne	RN 0,2µg/ml Mito vs. RN ohne	P 20ng/ml Mito vs. P ohne	RDB 2,5µg/ml Mito vs. RDB ohne	RN 0,2µg/ml Mito vs. P ohne	P 20ng/ml Mito vs. P ohne	RDB 2,5µg/ml Mito vs. RDB ohne	RN 0,2µg/ml Mito vs. P ohne	Bewertung
1	43	Typ II Membranprotein	NP 085070	20552	4,3										Schock unspezifisch
2															Reaktion auf Zytostatika, bei Resistenz fixiert
3	37	Acyl-CoA bindendes Protein	P07103	10044	6,1										Reaktion auf Zytostatika, bei Resistenz fixiert
4	37	Acyl-CoA bindendes Protein	P07103	10044	6,1										Reaktion auf Zytostatika, bei Resistenz fixiert
5															Reaktion auf Zytostatika, bei Resistenz fixiert
6	27	Tubulin Beta-1 Kette	P07437	49750	4,8										Schock unspezifisch
7															Schock unspezifisch
8	53	NHP2-ähnliches Protein 1	P55769	14174	8,7										Schock unspezifisch
9															Schock unspezifisch, nicht bei Resistenz
10	54	Proteasome Untereinheit alpha Typ 7	O14818	27887	8,6										Schock Mito spezifisch
11	33	pre-miRNA cleavage factor Im (25kD)	NP 008937	26277	8,9										Schock unspezifisch, nicht bei Resistenz
12	23	Heterogenes nukleäres Ribonucleoprotein A1	P09651	38846	9,3										Schock unspezifisch
13	40	Proteasome Epsilon Chain Precursor	P28074	22897	8,7										Schock unspezifisch, nicht bei Resistenz
14															Schock unspezifisch, nicht bei Resistenz
15		Unzureichendes Signal													Schock Dauno spezifisch
16	56	Ubiquitin-Konjugations Enzym E2-17 kDa	Q16781	17138	6,1										Schock Dauno spezifisch
17															Schock unspezifisch
18	25	RHO GDP-Dissolutionsinhibitor	P52565	23207	5,0										Schock Dauno spezifisch
19															Schock Dauno spezifisch
20		Unzureichendes Signal													Schock unspezifisch, nicht bei Resistenz
21		Unzureichendes Signal													Schock unspezifisch, nicht bei Resistenz
22		Unzureichendes Signal													Schock Dauno spezifisch
23	30	Heterogenes nukleäres Ribonucleoprotein A1	P09651	38846	9,3										Schock unspezifisch
24	20	Lysyl-tRNA Synthetase	Q01045	68034	5,9										Schock unspezifisch, nicht bei Resistenz
25	36	UNR-Interagierendes Protein	Q3Y3F4	38438	5,0										Schock unspezifisch
26		Kein eindeutiges Datenbankergebnis, möglicherweise P48047 - ATP Synthetase													Schock Dauno spezifisch
27	34	nukleärer Transportfaktor 2	P13652	14497	5,1										Resistenz Mito spezifisch
28	60	epidermales Fettsäure-bindendes Protein	Q01469	15164	6,6										Resistenz Mito spezifisch
29	74	Erythrocytenphosphatase 1, Isoenzyme F	P24666	18043	6,3										Resistenz unspezifisch
30	38	Proteinin Unterinheit 2	Q9UHV9	16648	6,2										Resistenz Mito spezifisch
31															Schock unspezifisch
32		Unzureichendes Signal													Schock unspezifisch
33	15	heterogenes nukleäres Ribonucleoprotein C1/C2	P07910	33299	5,1										Resistenz unspezifisch, induzierbar
34	15	heterogenes nukleäres Ribonucleoprotein C1/C2	P07910	33299	5,1										Schock unspezifisch
35	50	translacionale endoplasmatische Retikulum-ATPase	P55072	89322	5,1										Schock unspezifisch
36															Resistenz Mito spezifisch
37		Unzureichendes Signal													Schock unspezifisch
38	29	54kDa nukleäres RNA- and DNA-bindendes Protein	Q15233	54101	9,0										Schock unspezifisch
39	36	heterogenes nukleäres Ribonucleoprotein A2/B1	P22626	37460	9,0										Resistenz Mito spezifisch
40															Reaktion auf Zytostatika, bei Resistenz fixiert
41		Unzureichendes Signal													Reaktion auf Zytostatika, bei Resistenz fixiert
42	20	bifunktionelle Methylentetrahydrofolat Dehydrogenase	P13995	37321	8,9										Resistenz Dauno spezifisch
43	50	Enoyl-CoA Hydratase, mitochondriale Vorstufe	P30084	31372	8,3										Resistenz Dauno spezifisch
44	24	Transaldolase	P37637	37540	6,4										Resistenz Dauno spezifisch
45	42	Aspartat Aminotransferase, mitochondriale Vorstufe	P00505	47476	9,1										Resistenz Dauno spezifisch
46	31	Kollagenbindendes Protein 2 Vorstufe	P50454	46536	8,0										Resistenz Dauno spezifisch
47	33	47 kDa Hitzeschockprotein Vorstufe	P29043	46268	8,3										Resistenz Dauno spezifisch
48	50	Annexin I	P04083	38714	6,6										Resistenz Dauno spezifisch
49	9	Proteinase C, Eta Typ	P24723	77564	7,8										Resistenz Dauno spezifisch
50	62	Glutathion S-Transferase µ-Isoform	P21266	26689	5,4										Resistenz unspezifisch
51	38	Ubiquitin-Cytochrom C Reductasekomplex core Protein	P31830	52619	5,9										Resistenz Dauno spezifisch

Tabelle 7: Zusammenstellung der untersuchten Proteinspots. Die Identifikationsnummern der erfolgreich detektierten Proteine sind in der Tabelle als Swiss Protein-Nummern oder wenn angezeigt als NCBI-Nummer angegeben. Die Sequenz Erfassung entspricht der Menge, die durch die verdauen Peptide des untersuchten Spots die gefundene Sequenz abdeckt. Das Molekulargewicht ist in Dalton angegeben und entspricht dem exakten Molekularen wert des Proteins aus der Datenbank. Das gleiche gilt für den pH-Wert. Die unter therapeutischen Bedingungen herabregulierten (rot) und die hochregulierten Proteine (grün) sind unter allen Bedingungen (in allen sechs Vergleichen) indiziert. Daraus ergibt sich ein Muster, welches auf die Funktionelle Bedeutung der Expressionsveränderung Rückschlüsse erlaubt. Die entsprechende Interpretation ist in der Tabelle ganz recht angegeben.